Iranian Journal of Field Crops Research
Homepage: https://jcesc.um.ac.ir

Research Article
Vol. 21, No. 1, Spring 2023, p. 61-74

Photosynthetic Metabolism and Antioxidant System of Spike and Flag Leaf of Bread Wheat under Drought Stress

S. Navabpour[1*], S. GolCheshmeh[2], A. Mazandarani[3], H. Ahmadi-Ochtapeh[4]

Received: 04-05-2022 Revised: 11-06-2022 Accepted: 18-06-2022	**How to cite this article:** Navabpour, S., GolCheshmeh, S., Mazandarani, A., & Ahmadi-Ochtapeh, H. (2023). Photosynthetic Metabolism and Antioxidant System of Spike and Flag Leaf of Bread Wheat under Drought Stress. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *21*(1), 61-74. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jcesc.2022.76536.1169

Introduction

Drought stress and consequent lack of available water for plants is one of the main causes of accumulation of reactive oxygen species (ROS) in various organs of plants, which is effective in reducing the yield of cereals such as wheat. The antioxidant system, which contains various enzymes and genes, is responsible for removing and detoxifying plants from ROS. Unfortunately, genes responding to drought stress and their enzymatic activities associated with spike and flag leaf of wheat have received less attention. Therefore, in the present study, photosynthetic parameters, key enzymes of the antioxidant system, and expression analysis of some genes involved in this system under field capacity (FC) and drought stress (DS) conditions in spike and flag leaves of wheat were investigated.

Materials and Methods

The present study was performed in Azadshahr Research Center, Golestan Province, Iran in 2021. The wheat cultivar used in this study was Qaboos. This cultivar was cultivated under two experimental conditions of field capacity and drought stress in a randomized complete block design with three replications in the field. In the present study, differences in net photosynthesis (PN) rate, transpiration (E), stomatal conductance (gs), chlorophyll (Chl), relative water content (RWC), and the activity of APX, DHAR, MDHAR, and GR enzymes involved in the antioxidant system of flag leaf and spike of wheat were examined under field capacity and drought stress conditions. Transcription levels of APX, DHAR, MDHAR, and GR genes were measured using qRT-PCR under drought stress and field capacity conditions. Flag leaf and spike of Wheat for photosynthetic parameters and enzymatic activities at 0, 5, 10, 15, 20, and 25 and relative gene expression at 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20, and 25 days after anthesis (DAA) were harvested. The recorded data were analyzed by analysis of variance and all analyzes were performed by SPSS software. Mean differences were compared using Duncan's multiple range test at 5% probability level.

Results and Discussion

In general, the spike had a better capacity to maintain net photosynthesis, transpiration, stomatal

---

1- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Ph.D student, Department of Plant Breeding, Faculty of Crops Sciences, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran
3- Ph.D in Plant Breeding, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4- Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran
(*- Corresponding Author Email: s.navabpour@gau.ac.ir)
https://doi.org/10.22067/jcesc.2022.76536.1169

conductance, chlorophyll, and relative water content under drought stress conditions. This superiority reached its peak on the fifth day after anthesis. The enzymatic activity of the antioxidant system was normal under field capacity conditions. However, with the application of drought stress, APX, DHAR, MDHAR, and GR enzymes were affected in both spike and flag leaf of wheat and their activity increased, which indicates more activity of the antioxidant system in spikes and flag leaf of wheat for controls the level of ROS. After more days of grain filling, the activity of enzymes increased, and finally, after the plant entered the senescence stage, the activity of enzymes decreased to some extent. With drought stress, the antioxidant system in spike, especially from the 10th day after anthesis onwards, had a better performance. However, enzymatic activity in flag leaves under drought stress was not significantly different from field capacity conditions. Transcriptional levels of APX, DHAR, MDHAR, and GR genes associated with the antioxidant system increased under drought stress compared to field capacity conditions. It seems that the increase in enzymatic activity simultaneously with the increase in the level of transcription of the genes of the antioxidant system in the spikes and flag leaves of wheat is to counteract the oxidative damage.

Conclusion

In the present study, spikes of wheat played a more important role in responding to water deficiency through the antioxidant system than its flag leaf. The results of this study showed a high potential of the spike compared to flag leaf in the face of drought stress and this results in future breeding programs in wheat can play a key role in selecting drought-resistant cultivars with high yield.

Keywords: Enzyme activity, Flag leaf, Gene expression, Photosynthetic mechanism, Spike

نشریه پژوهشهای زراعی ایران

Homepage: https://jcesc.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۲۱، شماره ۱، بهار ۱٤۰۲، ص ۷٤-٦۱

مطالعه متابولیسم فتوسنتزی و سیستم آنتی‌اکسیدانی سنبله و برگ پرچمی گندم نان تحت تنش خشکی

سعید نواب‌پور[۱*]، ساسان گل‌چشمه[۲]، ابوالفضل مازندرانی[۳]، حسین احمدی‌اوچ‌تپه[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۸

چکیده

تنش خشکی، یکی از عوامل اصلی تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROSs) در اندام‌های مختلف گیاهان می‌باشد. این مسئله در کاهش عملکرد غلاتی همچون گندم تاثیرگذار است. سیستم آنتی‌اکسیدانی که شامل آنزیم‌ها و ژن‌های مختلفی است، مسئولیت سم‌زدایی گیاهان از ROSها را بر عهده دارد. در مطالعه حاضر، تفاوت در میزان فتوسنتزخالص (P_N)، تعرق (E)، هدایت‌روزنه‌ای (gs)، کلروفیل (Chl)، میزان‌نسبی‌آب (RWC)، فعالیت برخی آنزیم‌ها و سطح رونوشت ژن‌های آنزیمی دخیل در سیستم آنتی‌اکسیدانی سنبله و برگ‌پرچمی گندم تحت شرایط آبیاری‌کامل (FC) و تنش‌خشکی (DS) از ۰ تا ۲۵ روز پس از گرده‌افشانی بررسی شدند. طرح آزمایشی مورد استفاده بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بود. متوسط میزان پتانسیل آب خاک تیمار آبیاری‌کامل در حد ظرفیت مزرعه و تیمار تنش‌خشکی بر اساس رسیدن به محدوده ۷۰ درصد آب مورد نیاز گیاه تا حد ظرفیت مزرعه بود. سطوح رونویسی ژن‌های *APX*، *DHAR*، *MDHAR* و *GR* با استفاده از qRT-PCR اندازه‌گیری شد. به‌طور کلی، سنبله به‌ویژه تا روز پنجم پس از گرده‌افشانی با ثبت مقادیر (µmol) ۴/۵، (mmol) ۰/۳۶، (mmol) ۴۹، (mg/g FW) ۰/۵۳ و (٪) ۹۰ به‌ترتیب برای پارامترهای P_N، E، gs، Chl و RWC، ظرفیت بالایی به‌منظور مقابله با تنش خشکی در قیاس با برگ‌پرچمی داشت. تنش خشکی، عامل افزایش فعالیت‌های آنزیمی و بیان ژن سیستم آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه در روزهای ۱۵ الی ۲۰ پس از گرده‌افشانی بود و سنبله نسبت به برگ‌پرچمی افزون بر تجمع کمتر ROSها، درصد بیش‌تری از فعالیت آنزیمی و بیان ژن را داشت. این نتایج حاکی از پتانسیل بیش‌تر سنبله نسبت به برگ پرچمی در مقابله با تنش خشکی بود.

واژه‌های کلیدی: برگ پرچمی، بیان ژن، سنبله، فعالیت آنزیمی، مکانیسم فتوسنتزی

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum* L.) گیاهی هگزاپلویید با تعداد ۲n=۶x=۴۲ کروموزوم، از تیره غلات است (Emam, 2011). تنش خشکی یکی از شایع‌ترین تنش‌های غیرزنده محیطی می‌باشد و در کاهش عملکرد و کیفیت گندم نقش اساسی داشته و به‌عنوان یک چالش مهم برای اصلاح‌کنندگان گیاهان تبدیل شده است (Nezhadahmadi *et al.*, 2013). تنش خشکی باعث بروز دامنه وسیعی از واکنش‌ها در غلات، از تغییر بیان ژن و متابولیسم سلول تا تغییر در سرعت رشد و عملکرد گیاهان می‌شود (Reddy *et al.*, 2004). به‌عنوان نمونه، در مناطق خشک و نیمه‌خشک کاهش بارندگی و افزایش دما در اواخر فصل موجب بروز تنش خشکی شده معمولا با مرحله پرشدن دانه همزمانی دارد، این مرحله در گندم از بحرانی‌ترین مراحل نمو تحت تنش خشکی می‌باشد (Liu *et al.*, 2016). لذا، تنش خشکی می‌تواند در زمان پر شدن دانه‌ها از طریق کاهش هدایت روزنه‌ای، کاهش سنتز روبیسکو و افزایش تخریب آن، تخریب دستگاه فتوسنتزی و کاهش چشم‌گیر کلروفیل و در نهایت

۱- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، رشته اصلاح نباتات (بیولوژی مولکولی)، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی، رشته ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، گروه اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳- دکترای تخصصی اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۴- استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

(*- نویسنده مسئول: Email: s.navabpour@gau.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jcesc.2022.76536.1169

تسریع پیری برگ‌ها، سبب کاهش سرعت فتوسنتز و فتوآسیمیلات تولیدی و در نهایت افت عملکرد دانه شود (Rubia *et al.*, 2014).

تاثیر شرایط تنش‌زا محدود به تغییرات پارامترهای فتوسنتزی در گیاه نیست و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[1]) نیز افزایش می‌یابد. به‌عنوان مثال در اثر تنش خشکی، بسته شدن روزنه و در نتیجه کمبود CO_2 باعث کاهش فتوسنتزشده و به تشکیل بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن در کلروپلاست منجر می‌شود (Turkan *et al.*, 2005). برای جلوگیری از اثرات تنش اکسیداتیو و زنده ماندن گیاه در چنین شرایطی، گیاهان مکانیسم‌های بیوشیمیایی و فرآیندهای متعدد برای سازگاری جهت افزایش تحملشان به شرایط نامساعد برای حذف یا کاهش این ترکیبات مخرب دارا می‌باشند. از جمله این سازوکارها می‌توان به چرخه آسکوربات-گلوتاتیون (AsA-GSH[2]) اشاره نمود (Xu *et al.*, 2008). این چرخه، یکی از مهم‌ترین مولفه‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی، مسیری اساسی برای مهار H_2O_2 و مکانیسم موثر سم‌زدایی در سلول‌های گیاهی با استفاده از آنزیم‌های مرتبط با آن‌ها است. فعالیت همزمان آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز (SOD[3])، کاتالاز (CAT[4])، دهیدروآسکوربات‌ردوکتاز (DHAR[5]) و گلوتاتیون‌ردوکتاز (GR[6]) به‌عنوان قسمتی از این سامانه آنتی‌اکسیدانی، می‌تواند سلول را در مقابل ROSها حفاظت کند (Liu *et al.*, 2014). سیستم آنتی‌اکسیدانی اطلاعات لازم در مورد وضعیت ردوکس سلولی را نیز ارائه می‌دهد و بر روی رونویسی ژن‌هایی که مسئول پاسخ به تنش هستند تاثیر می‌گذارد تا حداکثر دفاع ایجاد شود.

با توجه به مطالب ذکر شده و همچنین معضل وجود تغییرات آب و هوایی، یکی از تکنیک‌های به‌نژادی که پژوهشگران به‌منظور افزایش پتانسیل عملکرد در گندم و بهبود سازگاری آن با شیوع فزاینده تنش‌های غیرزنده مانند خشکی به‌کار می‌برند، گزینش در جهت فتوسنتز بیش‌تر سنبله است (Tambussi *et al.*, 2007). در شرایطی که فتوسنتز برگ به دلایلی مانند بیماری و تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی محدود باشد، تعیین سهم فتوسنتز اندام‌های دیگر گندم از جمله سنبله و برگ پرچمی در عملکرد دانه مهم است (Robert *et al.*, 2005). همچنین مطالعات گذشته نشان داده است که فتوسنتز سنبله تحت شرایط تنش‌های محیطی، به‌عنوان جزء اصلی تامین کربن بذر در حال رشد می‌باشد (Abebe *et al.*, 2010; Sanchez-Bragado *et al.*, 2014) اما ژن‌های پاسخ‌دهنده به تنش خشکی و فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها که در ارتباط با سنبله و برگ پرچمی گندم هستند کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. از این رو، در مطالعه حاضر پارامترهای فتوسنتزی، آنزیم‌های کلیدی سیستم آنتی‌اکسیدانی و آنالیز بیان برخی از ژن‌های دخیل در این سیستم تحت شرایط آبیاری کامل (FC[7]) و تنش خشکی (DS[8]) در برگ پرچمی و سنبله گندم مورد بررسی قرار گرفتند تا تفاوت پاسخ‌های فیزیولوژیکی و متابولیکی اندام‌های مختلف گندم به تنش خشکی بهتر درک شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد

پژوهش حاضر در سال زراعی ۱۳۹۹ و ۱۴۰۰ در مرکز تحقیقات شهر آزادشهر استان گلستان انجام شد. شرایط اقلیمی منطقه مورد مطالعه در دوره رشد گیاه گرم و معتدل بود. همچنین میانگین بارندگی ماهانه فصل رشد در منطقه مورد کشت در جدول ۱ نشان داده شده است.

رقم گندم مورد استفاده در این مطالعه قابوس بود که به‌دلیل رواج کاشت در منطقه، عملکرد مناسب، ریشک‌دار بودن و تحمل نسبی بالا در برابر تنش خشکی مورد استفاده قرار گرفت. این رقم تحت دو شرایط آزمایشی آبیاری کامل و تنش خشکی در دو مکان، به‌صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه کشت شد. هر کرت آزمایشی دارای شش ردیف کاشت با طول ۲/۵ متر و فاصله ردیف ۲۵ سانتی‌متر بود. تراکم در واحد سطح ۳۰۰ دانه در متر مربع و فاصله بوته‌ها از یکدیگر بر روی ردیف‌ها پنج سانتی‌متر بود.

جهت آبیاری کامل، پنج دور آبیاری مطابق با عرف منطقه اعمال شد و با توجه به شرایط غیر یکنواخت مزرعه، متوسط میزان پتانسیل آب خاک تیمار آبیاری کامل در حد ظرفیت مزرعه نگه داشته شد. در تیمار تنش خشکی، آخرین آبیاری در ابتدای دوره گرده‌افشانی انجام شد و میزان آبیاری بر اساس رسیدن به محدوده ۷۰ درصد آب مورد نیاز گیاه تا حد ظرفیت مزرعه بود. برای اندازه‌گیری رطوبت خاک از دستگاه تانسیومتر که در چند نقطه از مزرعه به‌طور مداوم در طول فصل کشت در محدوده ریشه نصب شده بود استفاده شد. حجم آب مصرفی نیز با تامین آب در شرایط ظرفیت مزرعه (پتانسیل آب خاک در حد ۰/۳- بار) مشخص شد و برای رسیدن به این میزان پتانسیل آب، با انجام آزمایش‌های مستمر و ملاحظه تغییر عدد تانسیومتر تعیین شد. همین روند در مورد تیمار تنش خشکی با ۷۰ درصد آب مورد نیاز نسبت به ظرفیت مزرعه نیز انجام شد. همچنین وجود سقف متحرک (پناهگاه) با جلوگیری از تاثیر بارندگی بر گیاهان، بر دقت کار کمک موثر نمود.

1- Reactive Oxygen Species
2- Ascorbate-glutathione
3- Superoxide dismutase
4- Catalase
5- Dehydroascorbate reductase
6- Glutathione reductase
7- Field capacity
8- Drought stress

جدول ۱- میانگین میزان بارندگی ماهیانه فصل رشد در منطقه مورد بررسی
Table 1- The average monthly rainfall of the growing season in the study area

	آبان ۱۳۹۹ November 2020	آذر ۱۳۹۹ December 2020	دی ۱۳۹۹ January 2021	بهمن ۱۳۹۹ February 2021	اسفند ۱۳۹۹ March 2021	فروردین ۱۴۰۰ April 2021	اردیبهشت ۱۴۰۰ May 2021	خرداد ۱۴۰۰ June 2021
میانگین بارش ماهانه Average monthly rainfall (mm)	29.2	38.1	46.8	58.4	45.0	22.7	16.3	14.7

برگ‌های پرچمی و سنبله‌های گندم برای صفات میزان فتوسنتز خالص (P_N[1])، تعرق (E[2])، هدایت روزنه (gs[3])، کلروفیل و میزان نسبی آب و فعالیت‌های آنزیمی در ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ و برای صفت بیان نسبی ژن در ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز پس از گرده‌افشانی برداشت شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای فتوسنتزی

میزان فتوسنتز خالص، هدایت روزنه‌ای و میزان تعرق در برگ‌های پرچمی توسط دستگاه تبادلات گازی مدل LI-6400XT شرکت LiCor آمریکا مطابق با روش جیا و همکاران (Jia *et al.*, 2015) اندازه‌گیری شد. پارامترهای فتوسنتزی سنبله نیز توسط یک محفظه استوانه شیشه‌ای ویژه که به یک سیستم پرتابل فتوسنتزی متصل می‌شود، اندازه‌گیری شد (Ding *et al.*, 2018). اندازه‌گیری فتوسنتز در ساعت ۹ صبح تا ۱۱ صبح با چگالی شار فتون فتوسنتزی اشباع شده (PPFD) از ۱۰۰۰ میکرومول (فتون $m^{-2}s^{-1}$) در ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز پس از گرده‌افشانی بر روی پنج بوته به‌طور جداگانه برای هر تیمار انجام شد و در نهایت میانگین آن‌ها ثبت شد. مساحت برگ پرچمی با استفاده از معادله پیشنهادی راوسون و همکاران (Rawson *et al.*, 1988) به‌صورت زیر محاسبه شد:

$$LA = L \times W \times 0.75 \qquad (۱)$$

که در این رابطه L طول برگ، W عرض برگ، LA مساحت برگ و ۰/۷۵ ضریب ویژه گندم می‌باشد. محاسبه سطح سنبله طبق رابطه سطح لبه (حاشیه) بود.

اندازه‌گیری میزان کلروفیل

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل، مقدار ۰/۰۵ گرم نمونه برگی در ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. پس از گذراندن از کاغذ صافی حجم نهایی آن به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده و سپس در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر میزان جذب آن اندازه‌گیری شد (Bagheri, 2013).

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (RWC)

اندازه‌گیری محتوای نسبی آب (RWC[4])، مطابق با روش اسمارت و بینگهام (Smart & Bingham, 1974) بود. برای اندازه‌گیری RWC، تعدادی برگ پرچمی و سنبله کامل گندم را به‌طور تصادفی برای هر تیمار در هر تکرار در انتهای مرحله گرده‌افشانی برداشت کرده و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در آب مقطر خیسانده شده و وزن اشباع آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها را در آون گذاشته و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا وزن خشک به‌دست آید. میزان RWC به کمک رابطه (۲) محاسبه شد.

$$RWC\ [\%] = (FM-DM) / (TM-DM) \times 100\% \qquad (۲)$$

که در این رابطه RWC محتوای نسبی آب برگ (٪)، FM توده تازه، DM توده خشک و TM توده متورم می‌باشد.

اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی

فعالیت آنزیم آسکوربات‌پروکسیداز (APX[5]) با استفاده از روش چن و آسادا (Chen & Asada, 1989) محاسبه شد. بدین منظور تعدادی برگ پرچمی و سنبله گندم به‌طور تصادفی برای هر تیمار در هر تکرار در انتهای مرحله گرده‌افشانی برداشت شد. سپس، نمونه‌ها توسط نیتروژن مایع در هاون کوبیده شدند و نیم گرم نمونه پودری از آن‌ها برداشت شد. مخلوط واکنش شامل یک میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (PH=۷) یک میلی‌مولار EDTA، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۱/۵۴ میلی‌مولار هیدروژن پراکسید و ۵۰ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود. تخریب آسکوربات با کاهش جذب در طیف نوری ۲۹۰

1- Net photosynthesis
2- Transpiration
3- Stomatal conductance
4- Relative water content
5- Ascorbate peroxidase

نانومتر با دستگاه اسپکتوفوتومتر سنجیده شد. فعالیت GR با پیروی از کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر با توجه به روش گریس و لوگان (Grace & Logan, 1996) مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت‌های DHAR و MDHAR با افزایش سطح جذب در طول موج ۲۶۵ نانومتر بر اساس روش پینتو و همکاران (Pinto et al., 2000) ارزیابی شدند. مخلوط واکنش شامل ۵۰ میلی‌مول بافر سدیم فسفات با PH برابر هفت، ۰/۲۵ UAAO، دو میلی‌مول AsA، دو میلی‌مول NADPH و عصاره آنزیم بود.

استخراج RNA و qRT-PCR

نمونه‌برداری سنبله و برگ پرچمی جهت ارزیابی بیان ژن‌ها در زمان خمیری سخت مرحله ۸۷ مقیاس زیداکس صورت گرفت. حدود یک گرم نمونه از سنبله و برگ پرچمی در تیمارهای مختلف برای اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها برداشت شد و در نیتروژن مایع منجمد و تا مرحله استخراج RNA در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج RNA به‌روش ترایزول انجام شد و غلظت و خلوص آن از طریق دستگاه اسپکتوفوتومتری ساخت بیوتک تعیین شد. با استفاده از روش ترنس‌کریپتاز معکوس، عمل ساخت رشته اول cDNA انجام شد (Lou et al., 2018). آغازگرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش qRT-PCR

Table 2- Sequences of primers used in qRT-PCR

ژن‌ها Genes	شماره دسترسی Accession no.	جفت آغازگرها از '۵ به '۳ Primer pairs 5'-3'
APX	AY513263.1	F: AAAGCGAAGCATCCAAAG R: CAGAGGGTCACGAGTCCA
DHAR	AY074784	F: GTGCCTGTGTATAACGGTG R: ACAAGTGATGGAGTTGGGT
MDHAR	AK371371	F: AGAAGTTTACGCCCTTCGGC R: TTGGAATGTCATCGCCATC
GR	AY364467	F: GCACACGACCAAGCACATAT R: ATATCCGCCACCAAGAATAACG
GAPDH	U76558.1	F: TTCTCCCGCATCGACCACAAGTT R: TCCAGGGCAGCAAGATCCTCACG

واکنش qRT-PCR در دستگاه Light cycle 96 (روش، آلمان) همراه با مانیتور، نرم‌افزار و رک‌های اختصاصی (روش، آلمان) و با سه تکرار صورت پذیرفت. در این واکنش ۱۰ میکرولیتر سایبر پرمیکس اکس تگ، ۱/۶ میکرولیتر آغازگرهای اختصاصی ژن و دو میکرولیتر cDNA الگو به‌همراه ۵/۱ میکرولیتر آب فاقد RNase مخلوط گردید. برنامه زمانی-گرمایی دستگاه شامل سه دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور واسرشت‌سازی اولیه مولکول cDNA، سپس ۴۰ سیکل شامل ۱۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت‌سازی، ۱۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد جهت اتصال پرایمرها و ۱۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌منظور طویل‌سازی بود. همچنین پس از پایان یافتن سیکل‌ها، منحنی ذوب نمونه‌ها به‌منظور تعیین خلوص آن‌ها در بازه دمایی ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد رسم شد (Parvaee et al., 2016).

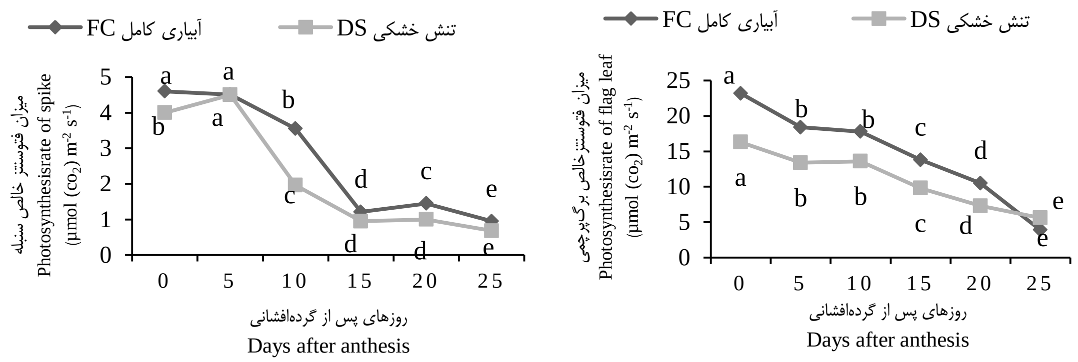
داده‌های ثبت شده نیز از طریق آنالیز واریانس تجزیه‌وتحلیل شدند و کلیه تحلیل‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد مقایسه شدند. لازم به توضیح است که اثر متقابل صفات مورد بررسی غیرمعنی‌دار بود و تجزیه و تحلیل آماری برای هر یک از شرایط تیماری (آبیاری کامل و تنش خشکی) به‌طور مستقل انجام شد.

نتایج و بحث

فتوسنتز خالص سنبله و برگ پرچمی

در مطالعه حاضر، میزان P_N اندام‌های سنبله و برگ پرچمی در شرایط آبیاری کامل بیش‌تر از شرایط تنش خشکی بود. روند تغییرات P_N در سنبله تحت تیمار خشکی نیز شامل افزایش موقتی آن (با مقدار ۴/۵ میکرومول) تا روز پنجم پس از گرده‌افشانی بود و پس از آن کاهش شدیدی را تجربه کرد. این در حالی است که مقدار P_N برگ پرچمی در موقعیتی مشابه با شیب نزولی ملایم‌تری نسبت به سنبله مواجه بود. با این حال، افزایش معنی‌دار میزان P_N سنبله از صفر تا پنج روز پس از گرده‌افشانی تحت تنش خشکی که مقارن با مراحل اولیه پر شدن دانه نیز می‌باشد، حاکی از توانایی سنبله در حفظ P_N در مقایسه با برگ پرچمی بود (شکل ۱). نتایج مشابهی توسط تمبوسی و همکاران (Tambussi et al., 2005) گزارش شده است. مطالعه

فتوسنتز سنبله و برگ پرچمی در گندم به‌دلیل وجود شواهدی مبنی بر ظرفیت بالای این اندام‌ها در تحمل به تنش خشکی است (Reynolds *et al.*, 2005). مطالعات پژوهشگران نشان داده است فتوسنتز سنبله و برگ پرچمی گندم طی تنش خشکی از عوامل مهم در جذب کربن و ترکیبات مهم در طی پر شدن دانه می‌باشند که در نهایت بر روی عملکرد دانه نیز اثر مثبت می‌گذارند (Jia *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016).



شکل ۱- میزان فتوسنتز سنبله‌ها و برگ‌های پرچمی پس از گرده‌افشانی تحت شرایط آبیاری کامل (FC) و تنش خشکی (DS). مقادیر با حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P <0.05 در هر تیمار آبیاری در طول زمان با توجه به آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.

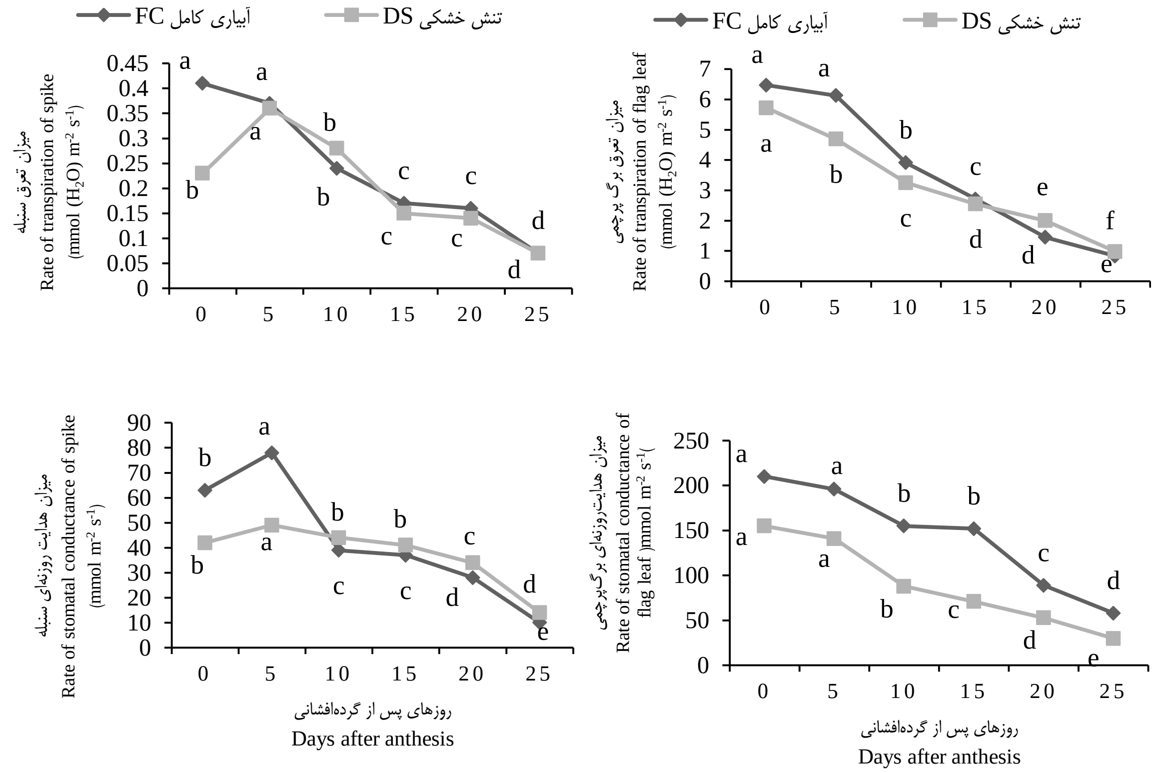
Figure 1- Photosynthesis rate of spikes and flag leaves of wheat after anthesis under Field capacity (FC) and Drought stress (DS) conditions. Values with different letters indicated the significant differences at P < 0.05 level in each stress treatment through time according to Duncan's multiple range test.

میزان تعرق و هدایت روزنه

با اعمال تنش خشکی، میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای در برگ پرچمی از صفر تا ۲۵ روز پس از گرده‌افشانی به‌طور پیوسته کاهش یافت. درحالی‌که، سنبله تحت تنش خشکی از صفر تا پنج روز پس از گرده‌افشانی به‌طور معنی‌داری با افزایش در میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای (به‌ترتیب با مقادیر ۰/۳۶ و ۴۹ میلی‌مول) مواجه بود، که علت آن می‌تواند به‌دلیل توانایی سنبله در حفظ آب و کاهش هدر رفت آب در شرایط تنش باشد (شکل ۲). لذا یکی از دلایل اصلی افزایش میزان فتوسنتز خالص سنبله از صفر تا پنج روز پس از گرده‌افشانی (شکل ۱)، افزایش میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای در زمان مشابهی بوده است. بسته شدن روزنه‌ها با اعمال تنش خشکی گرچه به‌منظور کاهش هدررفت آب صورت می‌گیرد، اما به واسطه ممانعت از ورود CO_2 می‌تواند فتوسنتز را به کم‌تر از نقطه جبرانی کاهش دهد (Shahinnia *et al.*, 2016). روزنه‌ها میزان مصرف آب و در نهایت مقدار عملکرد را در فرآیند فتوسنتزی تحت تاثیر قرار می‌دهند و بسته‌تر شدن روزنه‌ها مهم‌ترین عامل مرتبط با توقف فتوسنتز در مراحل اولیه تنش خشکی در گیاه است. اهمیت هدایت روزنه‌ای در این فرآیند تا حدی است که پژوهشگران به‌نژادی گیاهی از آن در شناسایی و انتخاب ارقام پر محصول و مقاوم به خشکی استفاده می‌کنند (Sharma *et al.*, 2012). از طرفی هر زمان که میزان تعرق از میزان جذب آب بیش‌تر می‌شود، گیاه با کاهش تعرق از طریق بستن روزنه‌ها برای کاهش اثرات منفی کمبود آب و بهبود بهره‌وری محصول در شرایط تنش خشکی مبارزه می‌کنند (Poljakoff-Mayber & Gale, 2012). به‌طور کلی، میزان فتوسنتز خالص، میزان تعرق و هدایت روزنه‌ای سنبله در مقایسه با برگ پرچمی در شرایط تنش خشکی حساسیت کم‌تری داشته و تا حدود زیادی می‌تواند به عملکرد دانه کمک کند. نتایج مشابه توسط لو و همکاران (Lou *et al.*, 2018) گزارش شده است.

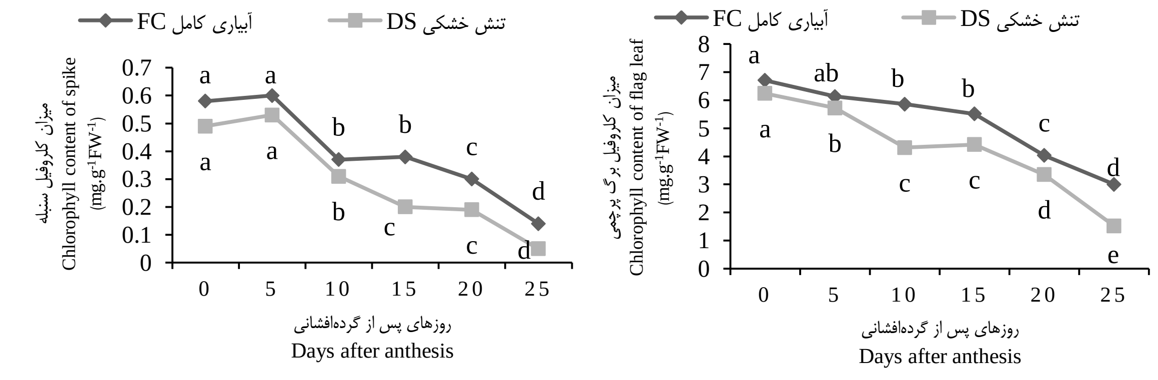
میزان کلروفیل

تنش خشکی باعث کاهش میزان کلروفیل برگ پرچمی در هر دو شرایط آبیاری شد. در حالی‌که سنبله در هر دو تیمار آبیاری (به‌خصوص در تیمار تنش خشکی) بین صفر تا پنج روز پس از گرده‌افشانی افزایش مطلوبی در میزان کلروفیل نشان داد و سپس کاهش یافت (شکل ۳). به‌نظر می‌رسد هنگامی که در اثر تنش خشکی کارایی فتوسنتزی برگ‌های پرچمی ناچیز می‌شود، حفظ اجزای فتوسنتزی در سنبله‌ها کمک می‌کند تا به‌عنوان منبع جذب در مرحله پر شدن دانه کار خود را ادامه دهند و در نهایت عملکرد را بهبود بخشند. پایداری نسبی میزان کلروفیل در سنبله گندم می‌تواند منجر به افزایش مدت زمان فتوسنتز در طول پر شدن دانه شود، که این مسئله به‌ویژه در ارقام متحمل به تنش خشکی حائز اهمیت است (Martinez *et al.*, 2003). از طرفی کاهش میزان کلروفیل در برگ پرچمی تحت تنش خشکی نیز می‌تواند باعث پیری زودرس در طی گلدهی شود (Huseynova, 2012). نتایج مشابه از تحقیقات مارتینز و همکاران (Martinez *et al.*, 2003) و دینگ و همکاران (Ding *et al.*, 2018) استنتاج شده است.



شکل ۲- میزان تعرق و هدایت روزنه سنبله‌ها و برگ‌های پرچمی پس از گرده‌افشانی تحت شرایط آبیاری کامل (FC) و تنش خشکی (DS). مقادیر با حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P <0.05 در هر تیمار آبیاری در طول زمان با توجه به آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.

Figure 2- The rate of transpiration and stomatal conductance of spikes and flag leaves of after anthesis under Field capacity (FC) and Drought stress (DS) conditions. Values with different letters indicated the significant differences at P < 0.05 level in each stress treatment through time according to Duncan's multiple range test.



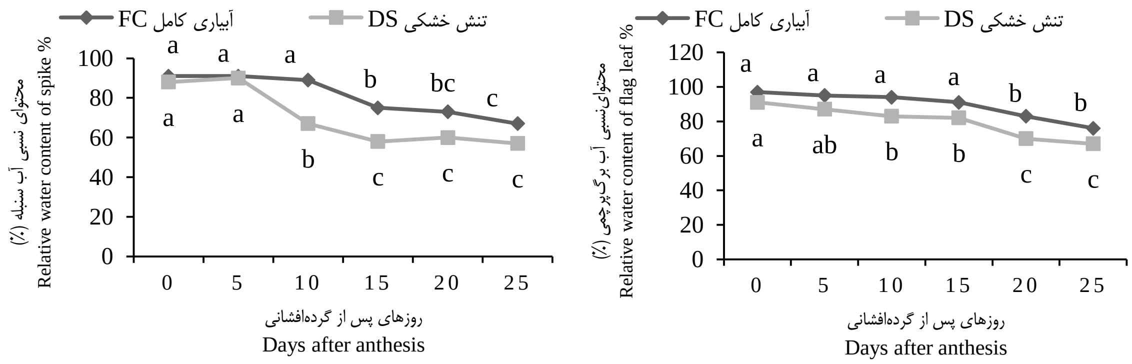
شکل ۳- میزان کلروفیل سنبله‌ها و برگ‌های پرچمی پس از گرده‌افشانی تحت شرایط آبیاری کامل (FC) و تنش خشکی (DS). مقادیر با حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P <0.05 در هر تیمار آبیاری در طول زمان با توجه به آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.

Figure 3- Chlorophyll content of spikes and flag leaves of wheat after anthesis under Field capacity (FC) and Drought stress (DS) conditions. Values with different letters indicated the significant differences at P < 0.05 level in each stress treatment through time according to Duncan's multiple range test.

میزان نسبی آب (RWC)

همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، علی‌رغم این‌که RWC برگ پرچمی در شرایط آبیاری کامل بالاتر از تنش خشکی است، اما تفاوت چشمگیری بین آن‌ها وجود ندارد و این کاهش اندک می‌تواند

ناشی از برهم خوردن تعادل آب گیاه طی تیمار خشکی باشد، نتایج مشابهی توسط باجی و همکاران (Bajjii *et al*., 2001) گزارش شده است. در سنبله، میزان نسبی آب در تیمار آبیاری کامل از ثبات بهتری برخوردار بود اما در تیمار خشکی یک افزایش موقتی از ۸۸ تا ۹۰ درصد در مقدار RWC تا روز پنجم پس از گرده‌افشانی مشاهده شد و بعد از آن شاهد کاهش RWC تا روز ۱۵ پس از گرده‌افشانی بود و سپس افزایش موقتی دیگری از ۵۸ تا ۶۰ درصد را بین روزهای ۱۵ تا ۲۰ پس از گرده‌افشانی تجربه کرد (شکل ۴). به‌نظر این افزایش‌های مقطعی نشان‌دهنده ظرفیت بالای سنبله در حفظ RWC و به‌عنوان اصلی‌ترین عامل مقاومت بیش‌تر در برابر تنش خشکی باشد. در مطالعه واردلا (Wardlaw, 2002) گزارش شده است اجزای سنبله گندم نان تحت تنش خشکی RWC بالاتری را نسبت به برگ‌های پرچمی حفظ کرده‌اند. قابل ذکر است که عملکرد نسبتا خوب فرآیندهای فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای در سنبله به‌ویژه در روزهای ابتدایی پر شدن دانه تحت تیمار خشکی (شکل‌های ۱، ۲ و ۳) نیز گواه بر ظرفیت بالای سنبله در حفظ RWC بیش‌تر در قیاس با برگ پرچمی است. هدف اصلاح‌گران گندم از بررسی RWC در سنبله و برگ پرچمی گندم، افزایش توانایی گیاه در حفظ مقادیر بیش‌تری آب در مواقع تنش خشکی است. زیرا RWC نقش مهمی در تحمل گیاه به کمبود آب به‌خصوص در شرایط تنش خشکی دارد (Siosemardeh *et al*., 2003). بر این اساس، ژنوتیپ‌های متحمل میزان نسبی آب بیش‌تری در شرایط تنش خشکی از خود نشان می‌دهند و از عملکرد بهتری نیز برخوردار خواهند بود. همچنین میزان نسبی آب نقش مهمی در تنظیم هدایت روزنه‌ای و در نتیجه سرعت فتوسنتزی گیاه دارد (Mitchell *et al*., 2001) که در نهایت می‌تواند روی عملکرد دانه اثر مثبتی داشته باشد. نتایج مشابه توسط واردلا (Wardlaw, 2002) گزارش شده است.

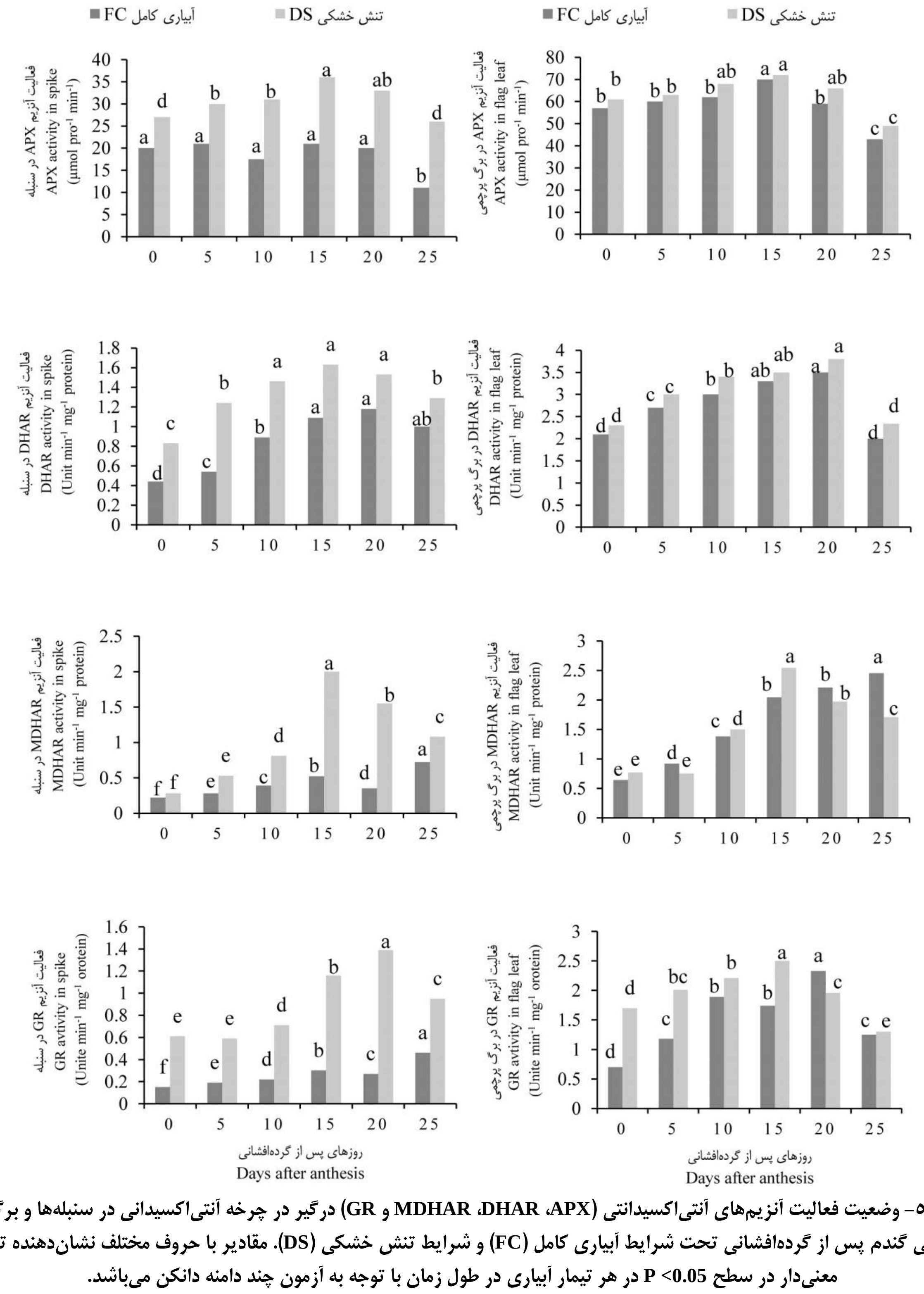


شکل ٤- میزان نسبی آب (RWC) سنبله‌ها و برگ‌های پرچمی پس از گرده‌افشانی تحت شرایط آبیاری کامل (FC) و تنش خشکی (DS). مقادیر با حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P <0.05 در هر تیمار آبیاری در طول زمان با توجه به آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.

Figure 4- Relative water content (RWC) of spikes and flag leaves of wheat after anthesis under Field capacity (FC) and Drought stress (DS) conditions. Values with different letters indicated the significant differences at P < 0.05 level in each stress treatment through time according to Duncan's multiple range test.

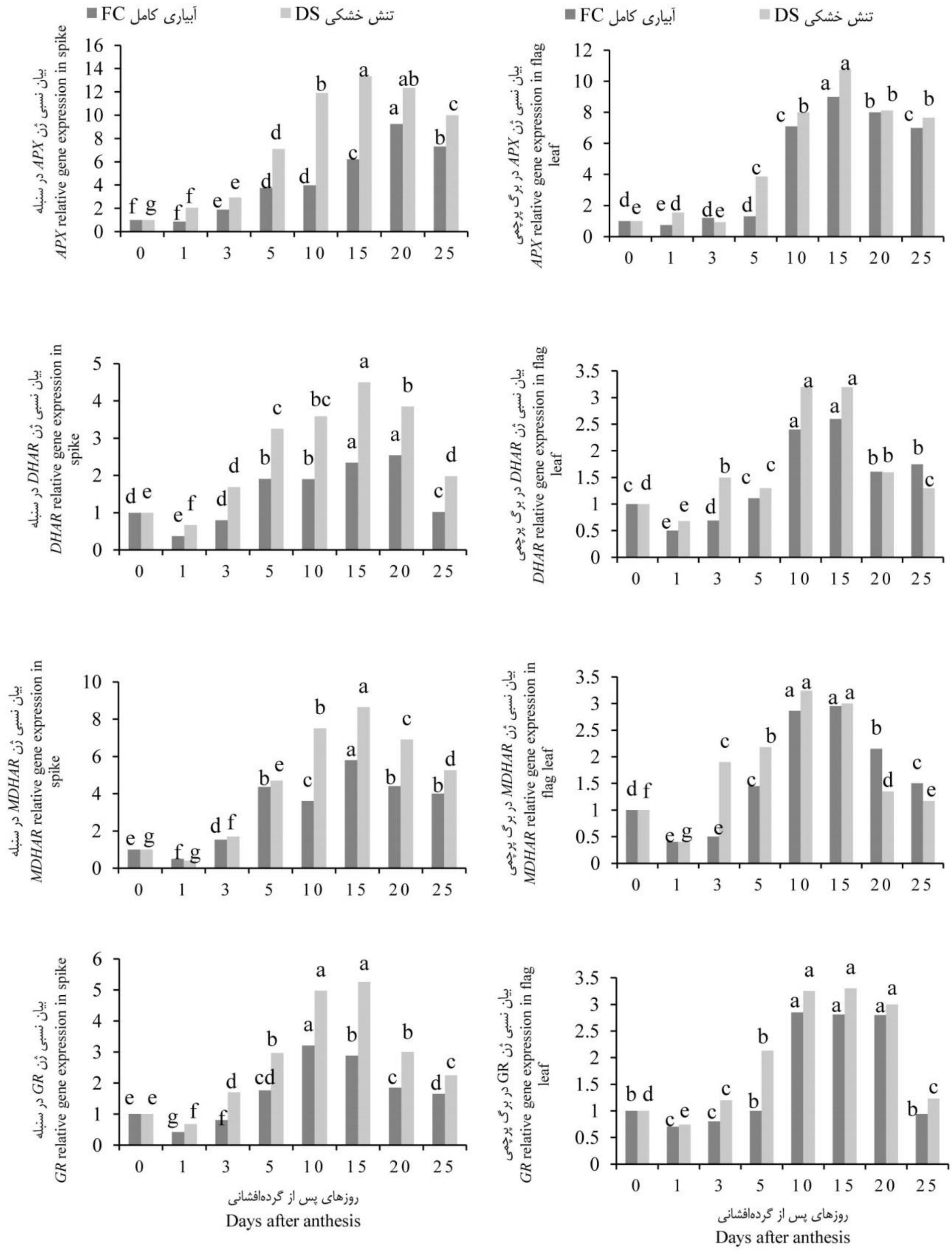
فعالیت‌های آنزیمی در سیستم آنتی‌اکسیدانی

در مطالعه حاضر، فعالیت برخی از آنزیم‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی از قبیل APX، DHAR، MDHAR و GR در سنبله و برگ پرچمی گندم تحت شرایط آبیاری کامل و تنش خشکی اندازه‌گیری شد. با توجه به شکل ۵ مشاهده می‌شود که در شرایط آبیاری کامل، سیستم آنتی‌اکسیدانی از فعالیت عادی خود برخوردار می‌باشد. اما با اعمال تنش خشکی، آنزیم‌های مذکور در هر دو اندام مورد مطالعه تحت تاثیر قرار می‌گیرند و فعالیت آن‌ها افزایش پیدا می‌کند که نشان‌دهنده فعالیت بیش‌تر سیستم آنتی‌اکسیدانی برای کنترل سطح ROSها می‌باشد (Moumita *et al*., 2019). حداکثر فعالیت این آنزیم‌ها در روزهای ۱۵ الی ۲۰ پس از گرده‌افشانی بود. به عبارت دیگر، با گذشت تعداد روزهای بیش‌تری از زمان پر شدن دانه، فعالیت این آنزیم‌ها نیز بیش‌تر شده و در نهایت بعد از وارد شدن گیاه به مرحله پیری، به نظر از فعالیت آنزیم‌های مذکور تا حدودی کاسته شد. در یک مقایسه بین سنبله و برگ پرچمی ملاحظه شد که با اعمال تنش خشکی، سیستم آنتی‌اکسیدانی در سنبله به‌خصوص روزهای حداکثر تنش، یعنی از روز ۱۰ پس از گرده‌افشانی به بعد عملکرد مطلوب‌تری را داشت. این در حالی بود که فعالیت آنزیمی در برگ پرچمی تحت تنش خشکی، تفاوت معنی‌داری را با شرایط عادی (آبیاری کامل) نداشت و حتی در برخی مواقع آنزیم‌های مورد مطالعه در شرایط آبیاری کامل فعالیت بهتری را دارا بودند (شکل ۵). همین مسئله به‌نظر نشان‌دهنده برتری سنبله در کنترل سطح ROS نسبت به برگ پرچمی بود.



شکل ۵- وضعیت فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی (APX، DHAR، MDHAR و GR) درگیر در چرخه آنتی‌اکسیدانی در سنبله‌ها و برگ‌های پرچمی گندم پس از گرده‌افشانی تحت شرایط آبیاری کامل (FC) و شرایط تنش خشکی (DS). مقادیر با حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P <0.05 در هر تیمار آبیاری در طول زمان با توجه به آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.

Figure 5- Activity status of antioxidant enzymes (APX, DHAR, MDHAR and GR) involved in the antioxidant cycle in spikes and flag leaves of wheat after anthesis under Field capacity (FC) and Drought stress (DS) conditions. Values with different letters indicated the significant differences at $P < 0.05$ level in each stress treatment through time according to Duncan's multiple range test.



شکل ٦- تغییرات سطح رونوشت شش ژن آنزیمی چرخه آنتی‌اکسیدان در سنبله‌ها و برگ‌های پرچمی گندم پس از گرده‌افشانی در شرایط آبیاری کامل (FC) و تنش خشکی (DS). مقادیر با حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P <0.05 در هر تیمار آبیاری در طول زمان با توجه به آزمون چند دامنه دانکن می‌باشد.

Figure 6- Changes in the transcript level of six enzymatic genes in the antioxidant cycle in spikes and flag leaves of wheat after anthesis under Field capacity (FC) and Drought stress (DS) conditions. Values with different letters indicated the significant differences at $P < 0.05$ level in each stress treatment through time according to Duncan's multiple range test.

در اثر تنش خشکی و یا کمبود آب در گیاه، تنش اکسیداتیو رخ می‌دهد که منجر به افزایش ROSها و در نهایت آسیب به متابولیسم عادی لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود که این مسئله یکی از دلایل اصلی کاهش عملکرد نیز است. پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنش خشکی به‌صورت افزایش در فعالیت آنزیم‌هایی است که مربوط به چرخه آنتی‌اکسیدانی هستند. با فعالیت این آنزیم‌ها تحت تنش خشکی، گیاه از تحمل نسبی بالایی برخوردار می‌شود که بر عملکرد نهایی محصول نیز تاثیرگذار است (Zhong *et al*., 2009). نتایج مطالعه ممتازخان و همکاران (Mumtaz-Khan *et al*., 2002) همسو با یافته‌های این مطالعه بود.

بیان ژن در سیستم آنتی‌اکسیدانی

در مطالعه حاضر بررسی سطوح رونویسی ژن‌های APX، DHAR، MDHAR و GR در سنبله و برگ پرچمی گندم در حد فاصل ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ روز پس از گرده‌افشانی تحت شرایط آبیاری کامل و تنش خشکی با استفاده از qRT-PCR به همراه ژن GAPDH به‌عنوان شاهد داخلی اندازه‌گیری شد. افزایش بیان ژن‌های مرتبط با چرخه آنتی‌اکسیدانی در شرایط تنش خشکی نسبت به آبیاری کامل، به‌نظر باعث تقویت توان گیاه به مقابله با کم آبی و حفظ ثبات عملکرد شده است (شکل ۶). در تایید این فرضیه، نتایج فعالیت‌های آنزیمی چرخه آنتی‌اکسیدانی که همسو با نتایج بیان ژن‌ها بود، بیش‌تر جلب توجه می‌کند (شکل ۵). به‌نظر می‌رسد، افزایش فعالیت‌های آنزیمی هم‌زمان با افزایش سطح رونوشت‌برداری ژن‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی در سنبله‌ها و برگ پرچمی گندم، به‌منظور مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو است. همچنین مطالعات مختلف نشان داده است در شرایط تنش خشکی، سنبله منبع اصلی جذب در طی پر شدن دانه است (Tambussi *et al*., 2007; Hein *et al*., 2016). لذا با توجه به نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، نمایش قدرتمند سازوکارهای مقاومت به تنش خشکی در سنبله نسبت به برگ پرچمی کاملا بدیهی است. در اثر القای تنش در روند تولید ROSها اختلال ایجاد می‌شود و منجر به افزایش مقادیر آن‌ها در سلول‌های گیاهی می‌شود (Gratao *et al*., 2005). چرخه آنتی‌اکسیدانی، که مهار ROSها را بر عهده دارد، در رونویسی ژن‌های پاسخ دهنده به تنش نیز مشارکت می‌کند (Kang *et al*., 2013). نتایج مشابهی در تحقیقات لو و همکاران (Lou *et al*., 2018) ارائه شده است.

نتیجه‌گیری

میزان تغییرات پارامترهای فتوسنتزی، فعالیت‌های آنزیمی و بیان ژن در سیستم آنتی‌اکسیدانی سنبله و برگ پرچمی گندم در دو شرایط آبی متفاوت (آبیاری کامل و تنش خشکی) مورد بررسی قرار گرفتند. روند تغییرات پارامترهای اندازه‌گیری شده در دو اندام مورد آزمایش متفاوت بود و عکس‌العمل متفاوتی نیز به شرایط تنش خشکی نشان دادند. سنبله در شرایط تنش خشکی در حفظ پارامترهای فتوسنتزی، میزان کلروفیل و میزان نسبی آب عملکرد مطلوب‌تری نسبت به برگ پرچمی داشت. همچنین فعالیت‌های آنزیمی و سطح رونوشت ژن‌های مورد مطالعه در سیستم آنتی‌اکسیدانی توسط تنش خشکی تحت تاثیر قرار گرفتند و نتایج نشان داد سنبله ظرفیت بهتری برای مقابله با تنش خشکی نسبت به برگ پرچمی دارد که همین امر فتوسنتز بالاتر و آسیب اکسیداسیون کمتر در سنبله را نیز توجیه می‌کند. به‌طور کلی در مطالعه حاضر، سنبله نسبت به برگ پرچمی نقش مهم‌تری در پاسخ به کمبود آب از طریق چرخه آنتی‌اکسیدانی داشت و نتایج این پژوهش در برنامه‌های به‌نژادی گندم می‌تواند نقش اساسی در انتخاب ارقام مقاوم به خشکی با عملکرد بالا ایفا کند.

References

1. Abebe, T., Melmaiee, K., Berg, V., & Wise, R. P. (2010). Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. *Functional & Integrative Genomics*, *10* (2), 191-205. https://doi.org/10.1007/s10142-009-0149-4
2. Bagheri, A. R. (2013). Comparison of bread and durum wheat photosynthesis and yield under salt stress and salicylic applying condition. *Plant Ecophysiology*, *5*(12), 1-11. (in Persian with English abstract).
3. Bajjii, M., Lutts, S., & Kinet, K. M. (2001). Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf aging in three durum wheat (*Triticum durum* Desf.) cultivars performing in arid conditions. *Plant Science*, *160*(4), 669-681. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00443-X
4. Chen, G. X., & Asada, K. (1989). Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties. *Plant Cell Physiology*, *30*(7), 987-998. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077844
5. Ding, H., Liu, D., Liu, X., Li, Y., Kang, J., Lv, J., & Wang, G. (2018). Photosynthetic and stomatal traits of spike and flag leaf of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under water deficit. *Photosynthetica*, *56*(2), 687-697. https://doi.org/10.1007/s11099-017-0718-z
6. Emam, Y. (2011). *Cereal production*. Shiraz University Press. Iran. (in Persian).

7. Gratao, P. L., Polle, A., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2005). Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology*, *32*(6), 481-494.
8. Grace, S. C., & Logan, B. A. (1996). Acclimation of foliar antioxidant systems to growth irradiance in three broadleaved evergreen species. *Plant Physiology*, *112*(4), 1631-1640. https://doi.org/10.1104/pp.112.4.1631
9. Hein, J. A., Sherrard, M. E., Manfredi, K. P., & Abebe, T. (2016). The fifth leaf and spike organs of barley (*Hordeum vulgare* L.) display different physiological and metabolic responses to drought stress. *BMC Plant Biology*, *16*, 1-12.
10. Huseynova, I. M. (2012). Photosynthetic characteristics and enzymatic antioxidant capacity of leaves from wheat cultivars exposed to drought. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1817*, 1516-1523. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2012.02.037
11. Jia, S., Lv, J., Jiang, S., Liang, T., Liu, C., & Jing, Z. (2015). Response of wheat ear photosynthesis and photosynthate carbon distribution to water deficit. *Photosynthetica*, *53*(1), 95-109. https://doi.org/10.1007/s11099-015-0087-4
12. Kang, G. Z., Li, G. Z., Liu, G. Q., Xu, W., Peng, X. Q., Wang, C. Y., Zhu, Y. J., & Guo, T. C. (2013). Exogenous salicylic acid enhances wheat drought tolerance by influence on the expression of genes related to ascorbate-glutathione cycle. *Biologia Plantarum*, *57*(4), 718-724. https://doi.org/10.1007/s10535-013-0335-z
13. Liu, E. K., Mei, X. R., Yan, C. R., Gong, D. Z., & Zhang, Y. Q. (2016). Effects of water stress on photosynthetic characteristics, dry matter translocation and WUE in two winter wheat genotypes. *Agricultural Water Management*, *167*, 75-85. https://doi.org/10.1016/j.agwat.2015.12.026
14. Liu, S., Liu, S., Wang, M., Wei, T., Meng, C., Wang, M., & Xia, G. (2014). A wheat SIMILAR TO RCD-ONE gene enhances seedling growth and abiotic stress resistance by modulating redox homeostasis and maintaining genomic integrity. *Plant Cell*, *26*(1), 164-180. https://doi.org/10.1105/tpc.113.118687
15. Liu, Y., Liang, H., Lv, X., Liu, D., Wen, X., & Liao, Y. (2016). Effect of polyamines on the grain filling of wheat under drought stress. *Plant Physiology & Biochemistry*, *100*, 113-129. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.01.003
16. Lou, L., Li, X., Chen, J., Li, Y., Tang, Y., & Lv, J. (2018). Photosynthetic and ascorbate-glutathione metabolism in the flag leaves as compared to spikes under drought stress of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLOS ONE*, *13*(3), 1-18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194625
17. Martinez, D. E., Luquez, V. M., Bartoli, C. G., & Guiamet, J. J. (2003). Persistence of photosynthetic components and photochemical efficiency in ears of water-stressed wheat (*Triticum aestivum*). *Physiologia Plantarum*, *119*(4), 519-525. https://doi.org/10.1046/j.1399-3054.2003.00195.x
18. Mitchell, R. A. C., Mitchell, V. J., & Lawlor, D. W. (2001). Response of wheat canopy CO_2 and water gas-exchange to soil water content under ambient and elevated CO_2. *Global Change Biology*, *7*(5), 599-611. https://doi.org/10.1046/j.1354-1013.2001.00431.x
19. Moumita, M., Mahmud, J. A., Biswas, P. K., Nahar, K., Fujita, M., & Hasanuzzaman, M. (2019). Exogenous application of gibberellic acid mitigates drought-induced damage in spring wheat. *Acta Agrobotanica*, *72*(2), 1-18. https://doi.org/10.5586/aa.1776
20. Mumtaz-Khan, M., Hendry, G. A. F., & Usman, M. (2002). Light promotes free radical processes in Citrus (*Citrus paradise* Macf.) seeds. *International Journal of Agriculture & Biology*, *4*(2), 199-203.
21. Nezhadahmadi, A., Hossain-Prodhan, Z., & Faruq, G. (2013). Drought Tolerance in Wheat. *The Scientific World Journal*, *11*(1), 610-721. https://doi.org/10.1155/2013/610721
22. Parvaee, P., Mondanizadeh, M., Khansarinejad, B., & Emami-Razavi, A. N. (2016). To select the appropriate reference gene for normalizing the quantitative data to assess microRNAs in plasma samples of patients with gastric cancer. *Journal of Arak University Medical Sciences*, *19*(5), 12-20. (in Persian with English abstract).
23. Pinto, M. C. D., Tommasia, F., & Garaa, L. D. (2000). Enzymes of the ascorbate biosynthesis and ascorbate-glutathione cycle in cultured cells of Tobacco Bright Yellow 2. *Plant Physiology & Biochemistry*, *38*(7), 541-550. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00773-7
24. Poljakoff-Mayber, A., & Gale, J. (2012). *Physiological basis and practical problems of reducing transpiration*. pp. 277-306. Plant responses and control of water balance. in: T. T. Kozlowski eds. Academic Press Inc., New York.
25. Rawson, H. M., Richards, R. A., & Munns, R. (1988). An examination of selection criteria for salt-tolerance in wheat, barley and triticale genotypes. *Australian Journal of Agricultural Research*, *39*(5), 759-772. https://doi.org/10.1071/AR9880759
26. Reddy, A. R., Chaitanya, K. V., & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, *161*(11), 1189-1202. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013
27. Reynolds, M. P., Mujeeb-Kazi, A., & Sawkins, M. (2005). Prospects for utilizing plant-adaptive mechanisms to improve wheat and other crops in drought-and salinity-prone environments. *Annals of Applied Biology*, *146*(2), 239-259. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2005.040058.x
28. Robert, C., Bancal, M. O., Ney, B., & Lannou, C. (2005). Wheat leaf photosynthesis loss due to leaf rust, with

respect to lesion development and leaf nitrogen status. *New Phytologist*, *165*(1), 227-241. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01237.x

29. Rubia, L., Rangan, L., Choudhury, R. R., Kamínek, M., Dobrev, P., Malbeck, J., Fowler, M., Slater, A., Scott, N., & Bennett, J. (2014). Changes in the chlorophyll content and cytokinin levels in the top three leaves of new plant type rice during grain filling. *Journal of Plant Growth Regulation*, *33*, 66-76.
30. Sanchez-Bragado, R., Elazab, A., Zhou, B., Serret, M. D., Bort, J., Nieto-Taladriz, M. T., & Araus, J. L. (2014). Contribution of the ear and the flag leaf to grain filling in durum wheat inferred from the carbon isotope signature: genotypic and growing conditions effects. *Journal of Integrative Plant Biology*, *56*(5), 444-454. https://doi.org/10.1111/jipb.12106
31. Shahinnia, F., Le-Roy, J., Laborde, B., Sznajder, B., Kalambettu, P., Mahjourimajd, S., Tilbrook, J., & Fleury, D. (2016). Genetic association of stomatal traits and yield in wheat grown in low rainfall environments. *BMC Plant Biology*, *16*, 1-14. https://doi.org/10.1186/s12870-016-0838-9
32. Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, *2012*, 1-26.
33. Siosemardeh, A., Ahmadi, A., Poustini, K., & Ebrahimzadeh, H. (2003). Stomatal and nonstomatal limitations to photosynthesis and their relationship with drought resistance in wheat cultivars. *Iranian Journal Agriculture Science*, *34*(4), 93-106. (in Persian with English abstract).
34. Smart, R. E., & Bingham, G. E. (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, *53*(2), 258-260. https://doi.org/10.1104/pp.53.2.258
35. Tambussi, E. A., Bort, J., Guiamet, J. J., Nogués, S., & Araus, J. L. (2007). The photosynthetic role of ears in C_3 cereals: metabolism, water use efficiency and contribution to grain yield. *Critical Reviews in Plant Sciences*, *26*(1), 1-16. https://doi.org/10.1080/07352680601147901
36. Tambussi, E. A, Nogués, S., & Araus, J. L. (2005). Ear of durum wheat under water stress: water relations and photosynthetic metabolism. *Planta*, *221*(3), 446-58. https://doi.org/10.1007/s00425-004-1455-7
37. Turkan, I., Bor, M., Ozdemir, F., & Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science 168*(1): 223-231. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.032
38. Wardlaw, I. F. (2002). Interaction between drought and chronic high temperature during kernel filling in wheat in a controlled environment. *Annals of Botany*, *90*(4), 469-476. https://doi.org/10.1093/aob/mcf219
39. Xu, J., Zhang, Y., Guan, Z., Wei, W., Han, L., & Chai, T. (2008). Expression and function of two dehydrins under environmental stresses in *Brassica juncea* L. *Molecular Breeding*, *21*, 431-438. https://doi.org/10.1007/s11032-007-9143-5
40. Zhong, L., Xu, Y., & Wang, J. (2009). DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*. *African Journal of Biotechnology*, *8*(22), 6201-6207. https://doi.org/10.5897/AJB09.1058